

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム（2007.12）8巻1号:61～65.

平成18年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題2 北方圏における特有な疾患の病態解明とその制御

伊藤 亮（研究班長）

依 頼 稿 (報告)

平成18年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題2 北方圏における特有な疾患の病態解明とその制御

伊 藤 亮* 清 水 恵 子** 安 部 裕 介*** 迫 康 仁*

平成18年度プロジェクト課題：「北方圏における特有な疾患の病態解明とその制御」では3件の研究課題が採択された。エキノコックス症、凍死、シラカンバアレルギー、それぞれまったく異なる研究テーマであるが共通項は「北方圏」、北海道である。

各研究課題名と研究代表者は1) 北海道で流行しているエキノコックス症の病態解析（寄生虫学講座・伊藤亮教授）、2) 積雪寒冷地での凍死の法医病態学的研究と診断確立（法医学講座・清水恵子教授）、3) シラカンバ花粉症に対するワクチン療法の開発（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座・安部裕介助教）である。

本稿では第58回旭川医科大学フォーラム（2007年10月19日）における発表者（迫康仁、清水恵子、安部裕介）から提出された報告書を掲載し、最後にコーディネーターの立場から伊藤亮が若干のコメントを加える形でまとめることにした。

研究成果の概要

1) 北海道で流行しているエキノコックス症の病態解析

【研究目的】

エキノコックス症は新興・再興感染症の中で最も致死的な難治性寄生虫疾患と位置づけられ、日本では北海道においてその流行が深刻化されている。それにも関わらず、エキノコックス症の病態に関する分子論的解析は殆どなされていないのが現状である。ある種の寄生虫ではシステインプロテアーゼが宿主組織への侵入や病原性に関与することが報告されている。本研究では、エキノコックス症においてもシステインプロテアーゼが病態に深く関与することが推察されることから、エキノコックス幼虫で発現しているシステイン

プロテアーゼをクローニングし、その性状解析を行った。

【研究成果の概要】

1) エキノコックス幼虫にて発現しているシステインプロテアーゼのクローニング

システインプロテアーゼの活性領域に保存されているアミノ酸配列を基にした縮合プライマーを設計し、エキノコックス幼虫 cDNA を鋳型として PCR を行い、システインプロテアーゼの一部分をクローニングした。その後、それをプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより2種類のシステインプロテアーゼ (EmCLP1 および EmCLP2) をクローニングした。

2) システインプロテアーゼの一次構造

EmCLP1 および EmCLP2 は、両者とも338個のアミノ酸をコードしており、成熟型酵素の予測分子サイズはそれぞれ、24.2 kDa および 23.5 kDa であった。2種類のシステインプロテアーゼは、リソソームシステインプロテアーゼであるカテプシンLの相同分子であった。それらの一次構造より予測される、基質結合部位（特に基質特異性を決定する部位）を構成するアミノ酸残基は興味深いものであった。つまり、EmCLP1 では、通常ロイシンのような疎水性アミノ酸残基が基質結合部位に存在するのに対し、親水性かつ負荷電をもつアスパラギン酸が存在していた。このような荷電したアミノ酸が基質結合部位に存在しているシステインプロテアーゼはヒトでは知られておらず、寄生虫特有の酵素活性が存在する可能性が示唆された。EmCLP2 は、その全長はカテプシンKよりカテプシンLに相同性を示すのに対し、基質結合部位のアミノ酸残基はカテプシンKに高い相同性を示していた。

*旭川医科大学 寄生虫学講座

**法医学講座

***耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

3) システインプロテアーゼに対する特異抗体の調製
EmCLP1 および EmCLP2 の酵素ドメインを大腸菌により発現し、それらを抗原として用いることにより、それぞれに特異的なモノクローナル抗体を調製した。

4) エキノコックス幼虫での発現の解析

それぞれのモノクローナル抗体を用いて、エキノコックス幼虫抽出抗原および分泌・排泄 (ES) 液に対してイムノブロット解析を行った。その結果、抗 EmCLP1 抗体は抽出抗原では 25.8kDa、ES 抗原では 25.8 および 26.1kDa の蛋白質を、抗 EmCLP2 抗体は抽出抗原では 25.8kDa、ES 抗原では 27.7 および 31.1kDa の蛋白質を認識した。これらの結果より、両酵素が蛋白質レベルで発現していること、また、一部が分泌されていることが明らかとなった。興味深いことに、TritonX-114 相分離法により膜蛋白質画分を調製しイムノブロット解析をしたところ、EmCLP2 が検出され、その一部が寄生虫細胞膜に結合している可能性が示唆された。次に、エキノコックス幼虫での局在を解析するために、免疫組織染色を行った。その結果、両酵素とも胚層、繁殖胞および原頭節で発現していることが確認できた。EmCLP1 に関しては、原頭節での発現は確認できたが、その染色性は他の部位に比してかなり弱いものであった。

5) 活性型 EmCLP1 および EmCLP2 の発現および酵素性状

活性型酵素は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて発現させ、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。その活性型酵素を用いて、ヒト IgG、ウシ血清アルブミン、I 型および IV 型コラーゲンおよびフィブロンネクチンに対する活性を調べた結果、両酵素ともにそれらを分解する活性を有していた。

【まとめ】

本研究では、エキノコックス幼虫で発現しているシステインプロテアーゼのクローニングおよびその酵素性状の解析を行った。エキノコックス幼虫のシステインプロテアーゼが宿主由来の蛋白質を分解する活性を持つことから、その病態への関与が強く示唆された。

2) 積雪寒冷地での凍死の法医病態学的研究と診断確立

【研究目的】

法医学的に特異的な所見をもたない凍死の診断は極めて難しい。一般的には、他に直接死因となる外傷、

中毒、疾病を除外し、状況及び凍死に比較的特徴的な幾つかの所見を総合的に判断し、最終的に凍死と診断される。凍死に比較的特徴的な所見とされる、鮮紅色死斑、左右心臓血の色調差、第一度凍傷 (紅斑)、胃粘膜下出血 (Wischnewski 斑)、矛盾脱衣、直接死因とはならないが、長時間の寒冷暴露を可能とする、血中・尿中のアルコール含有の有無や薬毒物含有の有無について、当講座は以前より検討を行ってきた。

生体において、酸素化ヘモグロビン (O_2 -Hb) 含有量の差に由来する、動脈血 (鮮紅色) 及び静脈血 (暗赤色) の色調差は当然であるが、一般に死体においては、凍死以外の死因でこの色調差は認められない。今回の研究助成資金によって、凍死体の左右心臓血の色調差の理由と考えられる、左右心臓血中の酸素化ヘモグロビン (O_2 -Hb) 含有量に関して検討を行った。動・静脈血の色調差及び酸素化ヘモグロビン (O_2 -Hb) 濃度から凍死の可能性を評価することができれば、除外診断が困難である検屍 (検案：医師による外表からの死後診断) のみで処理される凍死体事例において、凍死の診断がより容易になると考えられる。

【研究成果の概要】

【方法及び結果】①左右心臓血の色調差：道東・道北において、凍死と診断された検屍例102例及び解剖例74例についてレトロスペクティブに検討を行った。心臓血に肉眼的に左右差が認められた事例は、検屍例において81.4% (83例) であり、左右差が認められなかった事例は18.6% (19例) であった。解剖例においては、肉眼的左右差が認められた事例は95.9% (71例)、肉眼的左右差が認められなかった事例は4.1% (3事例) である。検屍では、確実に左右の心臓血を取り分けている確証がない為、解剖時と異なり、左右差のある割合が少なくなっている可能性が否定できない。一方、解剖例のうち、同時期に生じた凍死以外の外因死25例において、肉眼的左右差が認められたのは8% (2例)、差が認められなかった事例は92% (23例)、同時期に生じた内因死10例において、肉眼的左右差が認められたのは10% (1例)、差が認められなかった事例は90% (9例) であった。左右心臓血の色調差は、凍死に比較的特徴的な所見といえる。

②左右心臓血の酸素化ヘモグロビン (O_2 -Hb) の含有量の差：①で認められた左右心臓血の色調差は、血液中の酸素化ヘモグロビン (O_2 -Hb) の含有量の差であ

ると推定し、オキシメーターによる測定を行った。対象は、解剖により凍死と診断された27例、対照群は同時期に発生した凍死以外の外因死解剖事例25例、内因死解剖事例10例である。

測定に用いたのは、オキシメーター・チバコーニング270（チバ・コーニング・ダイアグノスティックス株式会社製）である。測定原理は、分光光度法である。

解剖により、除外診断を行い、状況を総合的に判断し、凍死と診断された事例27例において、左心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度は平均64.3%、右心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度は平均24.4%であり、その左右差は、40.2%、2.64倍であった。一方、同時期に解剖された凍死以外の外因死25例においては、左心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度は平均22.5%、右心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度は平均14.4%であり、その左右差は、8.09%、1.6倍であった。同時期に解剖された内因死10例においては、左心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度は平均38.0%、右心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度は平均19.3%であり、その左右差は18.8%、1.97倍であった。凍死体の左右心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度には、他の死因と比較して、有意差が認められた（ $p < 0.01$ 、paired t -検定）。左心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度が60%、差が40%および比が2.0を越える場合、凍死事例（14/27、52%）と他の死因（2/35、5.7%）で有意差（ $p = 0.0017$ 、 χ^2 乗検定）が認められ、非常に高い確率で凍死と診断できる。左心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 濃度が50%、比が1.5を越える場合、凍死事例（21/27、78%）と他の死因（3/35、8.6%）で有意差（ $p = 0.0002$ ）が認められ、かなりの確率で凍死と診断できる。

【考察】一般に生体においては、動脈血は $O_2\text{-Hb}$ の含有量が多く鮮紅色調を呈し、静脈血は組織が $O_2\text{-Hb}$ の酸素を消費する為 $H\text{-Hb}$ （還元型 Hb ）の含有量が多く、 $H\text{-Hb}$ の色を反映して暗赤色調を呈する。凍死以外の死因では、体内の血液中の $O_2\text{-Hb}$ の酸素は、死亡直前・直後に各組織で消費され、さらに死後物理的に酸素がヘモグロビンから解離することによって、 $H\text{-Hb}$ の含有量の高い血液（暗赤色調）が全身の血管内（動脈、静脈を問わず）に存在することになり、その結果、死斑は暗赤色調になる場合が多い。心肺停止による個体死の直後にも、組織は細胞レベルで完全には活動が停止しておらず、 $O_2\text{-Hb}$ の酸素を消費する場合が多い。一方凍死事例の場合、生体は死亡前一定期間（数時間）低温下に暴露され、全身の体温の低下に

伴って各組織での代謝が低下する為、組織での酸素消費量は低下した状態となっている。その結果、死後新しい $O_2\text{-Hb}$ が呼吸によって供給されない状態となっても、他の死因と異なり、凍死事例では、死亡直後に全身の血管内の $O_2\text{-Hb}$ の酸素は、細胞レベルでほとんど消費されず、そのまま保存される。また、死後も低温下に暴露されていると、低温下では $O_2\text{-Hb}$ からの酸素の物理的解離が抑制されるため、存在する $O_2\text{-Hb}$ は、より保たれる傾向となる。従って、凍死においては、左右心臓血の $O_2\text{-Hb}$ 含有量に、生体類似の左右差が認められる傾向があり、このことが、左右心臓血の色調差となって肉眼的に観察されることになると考えられる。同時に、体表の毛細血管に存在する血液の $O_2\text{-Hb}$ の含有量も、他の死因と異なり凍死事例では保存される傾向にあり、死斑は鮮紅色として観察されると考えられる。

【まとめ】

日本の検死制度では、解剖による除外診断がなされない検屍（検案）において、凍死の診断は極めて困難な傾向がある。平成18年、全道で北海道警察が扱った変死体数は6,258体、事件性が疑われて解剖となった事例は284体、解剖率は4.5%である。平成18年1年間の全道での凍死体は90体であったが、そのほとんどは検屍のみで処理されている。

本研究成果は、左右心臓血の色調差及び $O_2\text{-Hb}$ 濃度の測定が、凍死に比較的特徴的な所見であることを示し、診断価値が比較的高いことから、検屍を含めた法医実務に有用であることを示唆している。

3) シラカンバ花粉症に対するワクチン療法の開発

【研究目的】

シラカンバ花粉症は、北米、北欧に多く、本邦では主に北海道に認められる疾患である。花粉症の治療は対症療法が主体であり、抗原を用いた特異的免疫療法は治癒が期待できる唯一の方法である。しかし、抗原として用いられる蛋白にはB細胞エピトープを含むため、アナフィラキシーなどの重篤な副作用を生じる恐れがある。近年、安全かつ有効なワクチン療法として、T細胞が抗原を認識する部位であるエピトープペプチドを用いるペプチドワクチン療法が注目されている。ペプチドを特異的免疫療法に用いる場合、HLA分子の多様性が問題となるが、複数のHLAクラスII分子

に提示されるアミノ酸配列を有するT細胞エピトープ (promiscuous エピトープ) の同定が重要となる。本研究ではシラカンバ主要抗原 Bet v 1 における promiscuous エピトープの同定、さらに、同定ペプチドを用いて、患者および健康人より、アレルギー反応の制御に関与する CD4+ 制御性T細胞を誘導、シラカンバ花粉症に対して安全かつ有効なワクチン療法の開発を目的とする。

【研究成果の概要】

①promiscuous エピトープ候補ペプチドの選定およびペプチド特異的T細胞株の樹立

アルゴリズム解析ソフト「SYFPEITHI」を用いて、Bet v 1 のアミノ酸配列から HLA クラス II 分子に結合しやすい配列を選定、15残基長のペプチドを作成。シラカンバ花粉症患者および健康人の樹状細胞を抗原提示細胞として、CD4 陽性T細胞を同ペプチドで刺激することで抗原ペプチド特異的T細胞株を樹立した。

②ペプチドに対する血清 IgE の反応

候補ペプチドにB細胞エピトープが含まれていないことを確認するため、候補ペプチドおよび Bet v 1 蛋白を ELISA プレートに固相化した後、段階希釈した被験者血清をプレートに添加し、反応させ、HRP 標識抗ヒト IgE 抗体を添加、発色基質を加えて OD 値を測定した。Bet v 1 蛋白には IgE 抗体が結合するが、ペプチドには結合しないことが確認された。

③T細胞株の HLA 拘束性の検討

HLA クラス I、クラス II DR に特異的な抗体を用いてブロックした末梢血単核球を抗原提示細胞とし、T細胞株のペプチドおよび主要抗原である Bet v1 に対する増殖反応を検討、さらには種々の HLA クラス II DR を導入、発現しているマウス線維芽細胞；L cell を抗原提示細胞とし、T細胞株のペプチドに対する増殖反応を検討、同ペプチドは複数の HLA クラス II DR 分子に拘束される promiscuous エピトープを含むことが確認された。

④T細胞株のサイトカイン産生パターンの検討

ELISA 法を用いてT細胞株のサイトカイン産生パターンを検討した。

⑤制御性T細胞マーカーの検討

IL-10 を多く産生したT細胞株において、制御性T細胞のマーカーとされる forkhead box p3 (Foxp3)、CD25、glucocorticoid-induced tumor necrosis factor re-

ceptor-related protein (GITR) の発現を検討した。Foxp3 mRNA の発現は RT-PCR にて、CD25、GITR の細胞表面上の発現はフローサイトメトリーにて確認された。

【まとめ】

promiscuous エピトープ候補ペプチドを選定、同ペプチド特異的T細胞株が誘導された。同ペプチドは複数の HLA-DR 拘束性であり、promiscuous エピトープのひとつであることが示唆された。また、同ペプチドには IgE が結合する B細胞エピトープが存在しないことが確認された。以上より、同ペプチドは、シラカンバ花粉症に対して安全かつ有効なワクチン候補と考えられた。IL-10 を多く産生した細胞株において、制御性T細胞のマーカーである Foxp3 mRNA の発現、CD25 および GITR の発現上昇を認め、同ペプチドが誘導するT細胞株は、他のT細胞の増殖を抑制、すなわちアレルギー反応を制御する可能性が示唆された。

コメント

上記の3研究課題はいずれも北海道を中心に予測、予想される地域に根ざした疾患として今後さらなる研究展開が求められる研究課題である。単年度の研究で必ずしも十分な研究成果が上がるものではないが、本学における平成18年度「独創性のある生命科学研究（プロジェクト課題2：北方圏における特有な疾患の病態解明とその制御」採択研究課題として、今後も、継続的な研究を精力的に展開していただきたい。これらの研究が検屍を含めた法医学実務における EBM としての信頼性の向上、花粉症などアレルギー疾患の治療薬、エキノコックス症の治療薬の開発などで近い将来大きく発展することを期待したい。これらの採択研究テーマ以外でも本学で研究が展開されているシックハウスと健康の研究、ライム病病原体の増殖機構解析、冬眠を含む低温生理学的な研究あるいは温熱療法に関する研究、冬季におけるスリップ事故等による骨折、治療、リハビリ、介護の問題、冬季における食生活と高血圧など、北方圏特有の、あるいは北方圏から発信できる研究テーマが少なくない。このような地域に根ざしつつ、国際的な発信基地として本学の研究水準を向上させることは地方大学あるいは医科大学としての本学の活性化にとって非常に重要であろう。「一極集中巨大プロジェクトではなく、地方分散型の中規模プロジェクトが有用」、「地方大学における個性ある研究の拾い

上げによる全国レベルでの研究の底上げが必要」と機会あるごとに発信してきている。「地方大学の生き残りにはその大学の置かれた地域性、歴史等を十分に認識した上での活動以外に地方大学の特徴を出す方法は殆どない」というのが大方の地方大学の意見として聞こえてきている。いかに地域性を大事にし、最先端医学研究と結合させるかが地方大学で研究をしていく我々の力量として問われている時代であろう。最先端医学研究と地域性をもつ医学研究相互のバランスと融合を目指す形での研究を本学において大きく発展させていく必要がある。

「独創性のある生命科学研究」研究費に関しては、

旭医フォーラム誌上での研究概要報告以外に、きちっとした専門誌における論文発表を研究者の責務として評価していく出口調査システムの導入も今後必要であろう。そのためには、単年度の研究費ではなく複数年継続の研究費の導入も考慮すべきかもしれない。

また各講座、教室から毎年発表される研究業績を第一著者、コレスポンディング著者、その他の著者別に、点数化し、本学からの研究発信を客観的に評価するシステムを構築し、研究活性化に努める必要があろう。さらに各講座、教室における研究業績を事務局で自動的に掌握し、整合性のある大学ホームページを立ち上げることも必要であろう。